

POUVOIR ANTIBIOTIQUE D'*ARTHRIINIUM AUREUM* CALVO
ET *ARTHRIINIUM PHAEOSPERMUM* (CORDA) ELLIS

par M.A. CALVO, M.A. VIA, R.M. ALIS et R.M. CALVO*

RÉSUMÉ. — Étude de l'influence du milieu sur les caractères morphologiques et le pouvoir antibiotique de trois souches d'*Arthriniium aureum* et une souche d'*Arthriniium phaeospermum*.

SUMMARY. — Study of growth factors affecting morphological properties and antibiotic capacity of three stains of *Arthriniium aureum* and one of *A. phaeospermum*.

INTRODUCTION

Dans le département de Microbiologie de la Faculté de Pharmacie de l'Université de Barcelone (Espagne) on est en train d'étudier le genre *Arthriniium*. Il représente 0,4% de la totalité des champignons constituant de l'atmosphère de Barcelone (CALVO et al., 1980). Après avoir isolé et identifié une nouvelle espèce, *Arthriniium aureum* (CALVO et GUARRO, 1980), nous avons entrepris l'étude de ses caractéristiques morphologiques et sa capacité de produire l'inhibition d'autres microorganismes, comme d'autres auteurs l'ont déjà réalisé chez d'autres organismes (GANDY, 1970; GEZIORSKA, 1974 et WONG et KOEHLER, 1981).

MATÉRIEL ET MÉTHODES

L'étude réalisée est destinée à préciser la détermination des caractéristiques morphologiques et la capacité antibiotique de trois souches d'*Arthriniium au-*

* Département de Microbiologie, Faculté de Pharmacie, Barcelone, Espagne.

reum isolées de l'air, du sol et du lait et une d'*Arthrinium phaeospermum* isolée de l'air. Nous avons cultivé les souches dans 62 milieux de culture, 60 constitués par un milieu base additionné de concentrations croissantes de facteurs de croissance suivants : extrait de malt (20, 15, 10, 5, 1 et 0,1 g/l), extrait de levure (20, 10, 5, 1 et 0,1 g/l), biotine (0,5, 0,1, 0,05, 0,02, et 0,01 g/l), tyrosine (1, 0,5, 0,2, et 0,01 g/l) et pantoténate calcique (5, 0,5, 0,1 et 0,01 g/l) et deux autres milieux de routine utilisés dans notre laboratoire : le milieu de Wickerham et «antibiotic medium num. 1» (Difco). La moitié des 60 milieux ont comme source de carbone le dextrose et les autres le saccharose. La composition du milieu base est : $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ 1,5g; $\text{SO}_4\text{Mg}\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5g; NO_3K 2,0g; Cl_3Fe 0,01g; carbohydate 15g; agar 15g et eau distillée 1,0 l.

Lorsque les boîtes de Pétri sont préparées, on réalise l'inoculation des souches étudiées au centre et elles sont mises à incuber pendant 7 jours à quatre températures différentes : 15°C, 20°C, 28°C et à température ambiante pour établir aussi l'action de la température sur la croissance des souches.

Les caractères macroscopiques que nous avons considérés sont les suivants : production des gouttes d'exsudat, élaboration de pigment diffusible, diamètre des colonies, présence de mycélium blanc, formation de bords irréguliers et présence du revers foncé.

Le caractère microscopique plus important que nous avons considéré est le nombre, la situation et le diamètre des spores. Les microorganismes face auxquels on a essayé l'activité des souches du genre *Arthrinium* sont réunis dans le tableau 1.

Pour mieux voir la production des substances actives on a fait l'inoculation des souches suivant des méthodes différentes que nous avons dénommées A et B.

La méthode A citée par RAPER et THOM (1949), consiste à inoculer les souches du genre *Arthrinium* dans les boîtes de Pétri contenant le milieu de Wickerham et après deux jours d'incubation on met vis-à-vis de cette colonie les microorganismes gram positifs, gram négatifs, les champignons filamenteux et les levures déjà citées.

La production des substances actives se manifeste par la formation d'une zone d'inhibition de la croissance du microorganisme essayé près du front mycélien de la souche d'*Arthrinium*.

La base de la méthode B, est une modification de celle décrite par DABINETT et al. (1978). Nous avons préparé des suspensions titrées des microorganismes que nous avons incorporés dans le milieu de culture : agar extrait de malt à 2% pour les champignons filamenteux et levures et «antibiotic medium num. 1» (Difco) pour les bactéries. Quand le milieu de culture est solidifié on dispose régulièrement sur lui des disques d'une culture des souches d'*Arthrinium* qui se sont développées dans les 62 milieux de culture déjà cités pendant 7 jours. Les boîtes de Pétri sont incubées à 37°C pendant 24 h pour les bactéries et les levures et à 28°C pendant 48-72 h pour les champignons. Nous considérons

Tableau 1. — Microorganismes face auxquels l'activité des souches du genre *Arthriniium* ■ été testée.

BACTÉRIES

<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> (2)	<i>Proteus mirabilis</i> (3)
<i>Aeromonas hydrophyla</i> (3)	<i>Proteus mirabilis</i> urée - (3)
<i>Bacillus cereus</i> (2)	<i>Proteus morgani</i> TDA - (3)
<i>Bacillus megaterium</i> (2)	<i>Proteus rettgeri</i> (3)
<i>Citrobacter freundii</i> (2)	<i>Plesiomonas shigelloides</i> (3)
<i>Enterobacter aerogenes</i> (3)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (3)
<i>Enterobacter cloacae</i> (3)	<i>Pseudomonas cepacia</i> (3)
<i>Escherichia coli</i> (2)	<i>Pseudomonas putida</i> (3)
<i>Escherichia coli</i> indol - (3)	<i>Salmonella arizonae</i> (2)
<i>Escherichia coli</i> urée + (3)	<i>Salmonella</i> sp. (3)
<i>Escherichia coli</i> AD (3)	<i>Salmonella</i> sp. indol - (3)
<i>Hafnia alvei</i> (3)	<i>Serratia marcescens</i> (3)
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (3)	<i>Shigella sonnei</i> (3)
<i>Klebsiella</i> sp. VP - (3)	<i>Staphylococcus aureus</i> (2)
<i>Micrococcus luteus</i> (2)	<i>Yersinia enterocolitica</i> (3)
<i>Proteus inconstans</i> (3)	

LEVURES ET CHAMPIGNONS FILAMENTEUX

<i>Aspergillus flavus</i> (1)	<i>Cladosporium herbarum</i> (1)
<i>Aspergillus fumigatus</i> (1)	<i>Penicillium corylophilum</i> (1)
<i>Aspergillus niger</i> (1)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (1)
<i>Candida albicans</i> (1)	<i>Trichophyton mentagrophytes</i> (1)

(1) Souches de la collection de cultures de la Faculté de Pharmacie de Barcelone (Espagne).

(2) Souches de la collection de cultures de Bilbao (Espagne).

(3) Souches de la collection API System (La Balme, France).



Photo 1. — Inhibition de la croissance d'*Aspergillus niger* par la méthode B.

le résultat positif lorsqu'on observe une zone d'inhibition autour du disque d'*Arthriniium* (Photo 1).

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Après avoir étudié les résultats obtenus on peut dire que de tous les facteurs de croissance essayés, le plus favorable au développement des colonies, à la production de pigments et de gouttes d'exsudat des souches d'*Arthriniium* est l'extrait de malt à la concentration de 2% et à 28°C.

Si nous considérons la source de carbone, on peut dire que le dextrose favorise mieux la croissance des colonies d'*Arthriniium* que le saccharose.

On ne voit pas des différences remarquables concernant la présence de mycélium blanc, la formation de bords irréguliers, le nombre, la situation et le diamètre des spores et enfin la présence de revers foncé.

Concernant la capacité antibiotique, les résultats obtenus par la méthode A sont résumés dans le Tableau 2. On peut voir que la souche d'*Arthriniium aureum* isolée du sol présente la plus grande activité sur les bactéries essayées. Elle est active sur 18 microorganismes.

La souche isolée de l'air est la deuxième avec une action sur 16 bactéries. Pour les deux autres souches l'activité est plus réduite avec 9 et 4 bactéries sensibles dans chaque cas. Seulement deux bactéries *Acinetobacter calcoaceticus* var. *anitratus* et *Proteus mirabilis* urée négatif ont été sensibles aux quatre souches d'*Arthriniium*.

Les souches d'*Arthriniium aureum* sont actives seulement vis-à-vis de *Penicillium corylophilum* et *Aspergillus flavus*.

De tous les milieux de culture essayés par la méthode B, ceux qui ont permis de détecter une plus grande activité des souches d'*Arthriniium aureum* sur les bactéries ont été ceux qui sont constitués par le milieu de base dont la source de carbone était le saccharose sans addition d'aucun facteur de croissance et ceux qui avaient comme source de carbone le dextrose enrichis avec 20 g/l d'extrait de levure, ou 0,1 g/l de biotine, ou d'extrait de malt aux concentrations de 20 g/l, ou 15 g/l ou 1 g/l. Dans le cas d'*Arthriniium phaeospermum* les meilleurs milieux de culture pour l'expression de son activité sur les bactéries ont été le milieu de base constitué par le dextrose et l'addition de 1 g/l de tyrosine ou d'extrait de malt aux concentrations de 10 g/l ou 0,1 g/l. Les milieux de culture qui ont donné une plus grande activité sur les levures et les champignons filamenteux ont été, pour les souches d'*Arthriniium aureum*, le milieu de base dont la source de carbone est le dextrose et l'addition de 1 g/l d'extrait de levure ou 0,05 g/l de tyrosine ou de la biotine aux concentrations de 20 g/l, 15 g/l ou 0,1 g/l. Aussi les milieux de culture constitués par le saccharose et enrichis avec 20 g/l d'extrait de malt ou 0,1 g/l d'inositol ont permis aux souches d'*Arthriniium aureum* de montrer une plus grande activité sur les levures et champignons filamenteux essayés.

Tableau 2. — Résultats obtenus par la méthode A.

<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	+	+	+	+
<i>Aeromonas hydrophyla</i>	-	-	+	-
<i>Bacillus cereus</i>	+	-	+	-
<i>Bacillus megaterium</i>	+	-	-	-
<i>Citrobacter freundii</i>	-	-	-	-
<i>Enterobacter aerogenes</i>	-	+	-	-
<i>Enterobacter cloacae</i>	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	+	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> indol -	-	-	+	-
<i>Escherichia coli</i> urée +	+	-	+	-
<i>Escherichia coli</i> AD	-	-	+	-
<i>Hafnia alvei</i>	-	-	+	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	+	+	-
<i>Klebsiella</i> sp. VP -	+	-	+	-
<i>Micrococcus luteus</i>	+	-	+	-
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	-	-	-	-
<i>Proteus inconstans</i>	-	-	-	-
<i>Proteus mirabilis</i>	+	-	-	-
<i>Proteus mirabilis</i> urée -	+	+	+	+
<i>Proteus morgani</i> TDA -	-	-	+	-
<i>Proteus rettgeri</i>	+	+	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	+	-	+
<i>Pseudomonas cepacia</i>	+	+	+	-
<i>Pseudomonas putida</i>	+	+	+	+
<i>Salmonella arizonae</i>	-	-	-	-
<i>Salmonella</i> sp.	-	-	-	-
<i>Salmonella</i> sp. indol -	+	-	+	-
<i>Serratia marcescens</i>	-	-	-	-
<i>Shigella sonnei</i>	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-
<i>Yersinia enterocolitica</i>	-	-	-	-
<i>Aspergillus flavus</i>	+	+	+	+
<i>Aspergillus fumigatus</i>	-	-	-	-
<i>Aspergillus niger</i>	+	+	+	+
<i>Cladosporium herbarum</i>	+	+	+	+
<i>Penicillium corylophilum</i>	+	+	+	+
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	+	+	-	-
<i>Candida albicans</i>	-	-	-	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	-	-	-

+ : inhibition; - : no inhibition. A1 : *Arthriniium aureum* (air); A2 : *Arthriniium aureum* (lait); A3 : *Arthriniium aureum* (sol); A4 : *Arthriniium phaeospermum* (air).

Pour la souche d'*Arthrimum phaeospermum* le milieu avec dextrose et additionné de 0,2 g/l ou 0,01 g/l de tyrosine et aussi l'addition de biotine aux concentrations de 0,05 g/l ou de 0,01 g/l permet de montrer sa plus grande activité sur les levures et les champignons filamenteux.

De tous les résultats obtenus on peut déduire que le dextrose favorise l'activité de toutes les souches d'*Arthrimum* essayées. Les souches d'*Arthrimum aureum* sont les plus actives et l'extrait de malt est le facteur de croissance qui favorise le mieux cette activité et ainsi qui permet le meilleur développement des colonies et la production de pigment (van EIJK, 1975). La relation entre la production de pigment et d'antibiotique a été déjà montrée par WONG et al. (1981) avec *Monascus purpureus*.

BIBLIOGRAPHIE

- CALVO M.A., J. GUARRO, G. SUAREZ et C. RAMIREZ, 1980 — Airborne fungi in the air of Barcelona (Spain). IV. Various isolated genera. *Mycopathologia* 71 : 119-123.
- CALVO M.A. et J. GUARRO, 1980 — *Arthrimum aureum* sp. nov. from Spain. *Trans. Brit. mycol. Soc.* 75 (1) : 156-157.
- DABINETT P.E. et WELLMAN A.M., 1978 — Numerical taxonomy of certain genera of fungi imperfecti and Ascomycotina. *Can. Journ. Bot.* 56 (17) : 2031-2049.
- EIJK G.W., van, 1975 — Bostrycin, a tetrahydroantraquinone pigment and some other metabolites from the fungus *Arthrimum phaeospermum*. *Experientia* 31 : 783.
- ELLIS M.B., 1971 — Dematiaceous Hyphomycetes. Kew. Commonwealth Mycological Institute.
- GANDY D.G., 1979 — Inhibition of *Mycogone perniciosus* growth by *Acremonium strictum*. *Trans. Brit. mycol. Soc.* 72 (1) : 151-154.
- GEZIORSKA Z., 1974 — Ways affecting *Thielaviopsis basicola* by some antagonistic fungi. *Pam. Pulawski* 60 : 201-214.
- RAPER K.B. et THOM C., 1949 — A manual of Penicillia. Williams and Wilkins Co. Baltimore.
- WONG H.C. et KOEHLER P.E., 1981 — Production and isolation of an antibiotic from *Monascus purpureus* and its relationship to pigment production. *J. Food Sci* 46 (2) : 589-592.